

Title	Distinct roles of DNA polymerases $\delta$ and $\epsilon$ at the replication fork in <i>Xenopus</i> egg extracts
Author(s)	福居, 智行
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45136">https://hdl.handle.net/11094/45136</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	福 居 智 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 18409 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Distinct roles of DNA polymerases $\delta$ and $\epsilon$ at the replication fork in <i>Xenopus</i> egg extracts (アフリカツメガエル卵 <i>in vitro</i> DNA 複製における DNA ポリメラーゼ $\delta$ 、 $\epsilon$ の異なる役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 杉野 明雄 (副査) 教 授 升方 久夫    教 授 滝澤 温彦    助教授 和賀 祥

#### 論 文 内 容 の 要 旨

DNA ポリメラーゼ  $\delta$  及び  $\epsilon$  (Pol  $\delta$ 、 $\epsilon$ ) は、真核生物の DNA 複製における伸長反応に関わると考えられている。しかし、両者の役割の違いについては、わかっていない。そこで、この違いを調べるために Pol  $\delta$  または  $\epsilon$  を除去したアフリカツメガエル卵抽出液を調製し、精子クロマチンを鋳型とした DNA 複製に及ぼす影響を比較した。

Pol  $\delta$  または Pol  $\epsilon$  を除去した抽出液では、mock 処理抽出液と比べて DNA 合成量は著しく低下した。また、Pol  $\delta$  と  $\epsilon$  両方を除去すると、DNA 複製はほぼ完全に阻害された。さらに、合成された DNA 産物をゲル電気泳動で解析したところ、mock 処理抽出液では低分子 DNA 産物の蓄積は見られないのに対して、Pol  $\delta$  の除去では、約 500 bp から 10 kb の低分子 DNA 鎖が、また、Pol  $\epsilon$  の除去では、約 2 kb の低分子 DNA 鎖が蓄積した。これらの低分子 DNA 鎖は、異なるポリメラーゼを除去した抽出液を加えるとすみやかに伸長することから、複製中間体であると考えられる。

次に、Pol  $\delta$  または Pol  $\epsilon$  を除去した抽出液中で DNA 複製の進行に従いクロマチンに結合する因子の増減を調べたところ、Pol  $\delta$  除去抽出液ではラギング鎖合成で高頻度に働く RFC と PCNA および FEN-1 の増加が見られた。また、RPA の増加も見られた。これらの結果から、ラギング鎖合成が不完全となり短鎖 DNA が蓄積し一本鎖 DNA 領域が増えていることが示唆された。そこで複製反応後の DNA を精製し T4 DNA ポリメラーゼによる伸長反応を行ったところ、顕著な dNTP の取り込みが見られた。この結果は、一本鎖 DNA 領域の存在を示し RPA の蓄積と一致する。一方、Pol  $\epsilon$  除去抽出液では、このような現象は見られなかったが、DNA 伸長速度は、mock 処理抽出液の約 3 分の 1 であることから、Pol  $\epsilon$  も伸長反応に重要な役割を持つと考えられる。

以上の結果は、Pol  $\delta$  と Pol  $\epsilon$  の両者が染色体 DNA 複製の伸長反応に必要であることを示し、各々互いに相補できない固有の役割を担うことを示唆し、さらに、Pol  $\delta$  がラギング鎖合成に必須であることを示唆する。

## 論文審査の結果の要旨

学位申請者は、真核生物の DNA 複製に関わる主要な DNA ポリメラーゼである Pol  $\delta$  と Pol  $\epsilon$  の DNA 鎖伸長における役割を解明することを目的に、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた無細胞 DNA 複製系を利用した生化学的なアプローチで研究を進めた。両 DNA ポリメラーゼの酵素学的な解析ならびに遺伝学的な解析は過去になされているが、両 DNA ポリメラーゼがどのように細胞の染色体 DNA 複製に関わっているのかは不明であった。本申請者はこの問題の解明に向け、各々の DNA ポリメラーゼを抗体によって除去した時の複製について詳細な解析を行い、真核生物 DNA 複製の DNA 鎖伸長機構を理解する上で重要な幾つかの知見を得た。

本研究の解析の結果、両 DNA ポリメラーゼが DNA 鎖伸長過程においてそれぞれ固有の役割を有する可能性、さらにまた Pol  $\delta$  がラギング鎖合成に必須の役割をもつ可能性が示された。これらの知見は真核生物の DNA 複製における DNA 鎖伸長メカニズムの理解におおいに貢献するものである。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。